Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof.Dr.H.Hartwigk

VERSUCHE ZUR VERMEIDUNG DES ANAPHYLAKTISCHEN SCHOCKES BEI DER IMMUNISIERUNG VON KANINCHEN MIT ROTEN SCHAFBLUTKÖRPERCHEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eike Lange
Tierarzt aus
Heideanger/Lausitz

Berlin 1965
Journal Nr. 502

1965

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof.Dr.H.Hartwigk

VERSUCHE ZUR VERMEIDUNG DES ANAPHYLAKTISCHEN SCHOCKES BEI DER IMMUNISIERUNG VON KANINCHEN MIT ROTEN SCHAFBLUTKÖRPERCHEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eike Lange
Tierarzt aus
Heideanger/Lausitz

Berlin 1965
Journal Nr. 502

Dekan: Prof.Dr.J.Boch

Referent: Prof.Dr.H.Hartwigk

Korreferent: Prof.Dr.J.Boch

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1965

Tag der Promotion 1. August 1965

Meinen Eltern

gewidmet

Inhalt

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Literatur	3
III.	Eigene Versuche	20
	1. Material	20
	2. Technik	21
	Gewinnung und Behandlung der Schaferythrozyten	
	Gewinnung und Behandlung des Komplementes	
	Injektionsarten	
	Auswertung des Ambozeptors	
	Entbluten	
	3. Ergebnisse	27
	1.Methode nach ULRICH und MC ARTHUR	
	2.Methode nach SAWYER und BOURKE	
	3.Methode nach Anweisung des HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamtes	
	4.Methode nach DARTER	
	5.Gesamtergebnis	
IV.	Besprechung	38
V.	Zusammenfassung	44
VI.	Literaturverzeichnis	45

I. Einleitung

Seitdem BORDET und GENGOU (7) im Jahre 1898 die Komplementbindungsreaktion (KBR) als serologische Untersuchungsmethode zum erstenmal angewendet haben, hat die Reaktion ihre Bedeutung behalten. Man kann sogar sagen, daß dieses Verfahren nach Entdeckung der Viren noch an Bedeutung gewonnen hat. Das gilt sowohl für die Typisierung von Bakterien und Viren, als auch für den Antigennachweis in Organmaterial von Tieren, die an einer Virusseuche gestorben sind.

Die Herstellung des für die KBR benötigten haemolytischen Ambozeptors wird durch Immunisierung von Kaninchen mit roten Hammelblutkörperchen vorgenommen und liegt hauptsächlich in Händen der Serumwerke. Langjährige Erfahrungen wurden in diesen Werken gesammelt, ohne daß sie der Öffentlichkeit bekannt wurden. Die Untersuchungsämter und Institute verzichteten in der Regel auf die mit vielen Unsicherheitsfaktoren belastete Selbstherstellung des haemolytischen Ambozeptors und bezogen ihn aus dem Handel. Sie konnten sich daher in der Regel über die Brauchbarkeit der zur Verbesserung vorgeschlagenen Methoden kein Urteil bilden. Die Vorschläge blieben daher gewissermaßen im leeren Raum, denn sie wurden nicht nachgeprüft, und niemand wußte, ob sie mit Aussicht auf Erfolg angewendet werden konnten.

Mir war die Aufgabe übertragen worden festzustellen, ob die von ULRICH und MC ARTHUR (54) empfohlene Methode, Kaninchen mit Schafserum vorzuspritzen, um dann Injektionen mit gewaschenen Schaferytrozyten folgen zu lassen, geeignet ist, die oft bei den letzten Injektionen von Schafblutkörperchen auftretenden anaphylaktischen Erscheinungen zu vermeiden oder abzuschwächen. Dabei sollte eine Verringerung der Wirksamkeit des Ambozeptors nicht in Kauf genommen werden. Bei unbefriedigendem Erfolg mit dieser Methode war vorgesehen, weitere von anderen Autoren vorgeschlagene Verfahren zu überprüfen.

Von besonderem Interesse war, ob mit der von KOSCHUCHAROFF (30) empfohlenen Anwendung von Antihistamin anaphylaktische Erscheinungen ohne Minderung der Wirksamkeit des Ambozeptors ausgeschlossen werden konnten.

II. Literatur

Ende des vorigen Jahrhunderts hat Paul EHRLICH versucht, den Wirkungsmechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion mit Hilfe der sog. Seitenkettentheorie zu erklären. Die Spezifität der Reaktion wird durch die unterschiedlichen Rezeptoren (Seitenketten), die jeweils wie ein Schlüssel zum Schloß zueinander passen, gedeutet. Zu einem Antigen paßt also nur ein spezieller Antikörper. Ambozeptoren sind Antikörper gegen Fremdeiweiße. EHRLICH ordnet die Ambozeptoren als Rezeptoren dritter Ordnung ein und bezeichnet sie als Zytolysine. Diese besitzen eine zytophile und eine komplementophile Seitenkette. Die zytophile Seitenkette bindet die antigen wirkende Zelle und die komplementophile den Aktivator Komplement an den Antikörper. Antikörper, die rote Blutkörperchen einer bestimmten Tierart (z.B. des Schafes) auflösen, sind haemolytische Ambozeptoren oder Haemolysine. Die Haemolyse läuft nur ab, wenn freies Komplement zur Verfügung steht. Das Komplement soll sich im Blut aller warmblütigen Tiere befinden. Untersuchungen, die HARTWIGK (26) in früheren Jahren bei Rind, Pferd, Schaf, Kaninchen, Ratten und auch Menschen durchgeführt hat, zeigten jedoch, daß bei diesen Individuen in keinem Falle ein Komplement nachweisbar war, das in seiner Aktivität an die des Meerschweinchenkomplementes heranreichte. Es ist daher verständlich, daß für die KBR ausschließlich frisches Meerschweinchenserum als Komplement dient.

Das Komplement soll aus mehreren Komponenten bestehen, die nach verschiedenen Richtungen die Reaktion beeinflussen. Wie sich der Reaktionsablauf im einzelnen vollzieht, ist nicht geklärt.

Die KBR ist von WASSERMANN und BRUCK (57) für die Syphilis-Diagnose modifiziert worden und als Wassermann-Reaktion (Wa.R.) bekannt. SACHS (44) unterteilt die Haemolysine in 4 Gruppen:

"1) Heterolysine, die auf die Blutkörperchen einer Art wirken.
2) Isolysine, die auf die Blutzellen fremder Individuen wirken.
3) Autolysine, die auf die Blutzellen des eigenen Individuums wirken.
4) Gruppenlysine, die auf die Blutkörperchen verschiedener Arten wirken, ohne daß der Wirkungsbereich systematisch durch zoologische Verwandtschaft der Tierarten bestimmt ist."

Nach dieser Einteilung sind haemolytische Ambozeptoren Heterolysine, die wie Antikörper nach Immunisierung eines Tieres mit roten Blutkörperchen einer anderen Tierart gebildet werden. Nach SCHMIDT (50) sind Lymphknoten und Milz vorwiegend an der Antikörperbildung beteiligt. Plasmazellen und vermutlich auch Lymphozyten unterstützen die Antikörperproduktion. ENGELHARDT (17) stellte fest, daß der N.sympaticus einen Einfluß auf die Antikörperbildung hat und aktivierend wirkt. Doch ist das sympatische Nervensystem nicht ausschließlich für die Antikörperbildung verantwortlich, da auch in entnervten Geweben und in der Gewebekultur Antikörper gebildet werden können. SACHS (46) stellte fest, daß 2 - 3 Tage nach intravenöser (i.v.) Injektion von Fremdblut und 7 Tage nach subcutaner (s.c.) Injektion im Blut die ersten Ambozeptoren nachweisbar sind. Freie Ambozeptoren treten in der Regel erst auf, wenn alles Fremdblut haemolysiert ist. Diese Haemolyse des fremden Blutes geschieht unter Mitwirkung spezifischer Ambozeptoren, sobald diese auf die Injektionen hin gebildet sind.

EHRLICH und MORGENROTH (16) machten - wenn auch anfangs nicht direkt für die KBR - die ersten Angaben über die technische Herstellung des haemolytischen Ambozeptors in ihren Mitteilungen "Über die Haemolysine". Sie sensibilisierten eine Tierart gegen das Blut einer anderen, wobei

ihnen als Hauptversuchstiere Ziegen, Schafe, Kaninchen und Meerschweinchen zur Verfügung standen. Zunächst injizierten sie 8 Monate lang einer Ziege subcutan Hammelblut und stellten fest, daß etwa 1,0 ml Ziegenserum 5,0 ml 3%ige Hammelblutkörperchen-Suspension bei 37°C vollständig lösten. In späteren, gezielten Versuchen konnte die Wirksamkeit des Serums bis auf die Verdünnung 1 : 50 durch regelmäßiges subcutanes Injizieren von steigenden Dosen Hammelvollblut erhöht werden. Beide Autoren erklären die Haemolyse durch Wechselwirkung von Erythrozyten, Immunkörpern und Komplement. WASSERMANN und BRUCK (57) erläuterten die Reaktion näher. Es wurden die verschiedensten Versuche unternommen, um die Ambozeptorgewinnung zu verbessern. Sensibilisierungsversuche erfolgten an Kaltblütern (35) und den verschiedenen Warmblütern (Pferd (8), Mulis (53), Taube (44)), ohne daß es gelang, zu besseren Ergebnissen zu kommen, Schließlich erkannte man, daß der haemolytische Ambozeptor für die KBR am besten von Kaninchen gewonnen werden konnte, die mit roten Blutkörperchen vom Hammel sensibilisiert worden waren. Die Applikationsarten für die Blutkörperchen unterscheiden sich beträchtlich. BERTARELLI (5) gelang eine "aktive Immunisierung" bei bis 2 Tagen alten Kaninchen, wenn er das Hammelblut per os gegeben hatte. Der Autor konnte allerdings nur sehr geringe Mengen haemolysierende Antikörper feststellen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam METALNIKOFF (38) bei alten Kaninchen, denen er regelmäßig Hammelblut verfütterte. Beide Autoren geben nicht an, wie hoch die Titer ihrer haemolytischen Ambozeptoren waren. Da bei den meisten Kaninchen mit einer, wenn auch geringen, unspezifischen Reaktion des Serums gegen Hammelblutkörperchen zu rechnen ist (1,28), bleibt ungeklärt, ob die erzielten Titer auf Normalhaemolysine zurückzuführen waren.

ABDERHALDEN (1) schlägt zur Ambozeptorgewinnung zwei bis höchstens drei intraperitoneale (i.p.) Injektionen von 20 - 30 ml Hammelblut im Abstand von 6,8 oder 10 Tagen

vor und konnte mit dieser Methode ausreichende Titer erzielen. SACHS (45) empfiehlt, 2 - 3 mal im Abstand von 3 Tagen 20 - 30 ml gewaschene Hammelblutkörperchen i.p. zu injizieren. 7 Tage nach der letzten Injektion erfolgte die Auswertung. Es ergaben sich Minimaltiter von 1 : 1000 bis 1 : 2000.

VASSILJEVA (55) beschreibt eine Methode, die bei intrapulmonaler Applikation zu einem brauchbaren haemolytischen Ambozeptor führt. Die Verfasserin weist aber darauf hin, daß die durch intravenöse Injektionen hergestellten Ambozeptoren hochwertiger seien. DARTER (13) wendete über 18 Jahre lang die nachstehend angegebene Methode an und erreichte einen Titer von 1 : 20 000. ("A titer of 1 - 20 000 proved to be average"). Die Ambozeptorauswertung erfolgte nach der Kolmer-Methode (29). Die Blutkörperchen-injektionen wurden in folgender Weise vorgenommen:

1. Tag 0,5 ml Gesamtblut intracutan
3. Tag 1,0 ml Gesamtblut intracutan
5. Tag 1,5 ml Gesamtblut intracutan
7. Tag 2,0 ml Gesamtblut intracutan
9. Tag 2,5 ml Gesamtblut intracutan
12. Tag 1,0 ml 20%ige Hammelblutkörperchen-Suspension i.v.
15. Tag 1,0 ml 20%ige Hammelblutkörperchen-Suspension i.v.

Die Titerauswertung wurde am 18. Tag durchgeführt. Bei befriedigendem Ergebnis wurde das Tier am gleichen Tage entblutet.

Als intravenöse Injektionsmethode schlugen SACHS (45) und SACHS und KLOPSTOCK (47) vor, dreimal im Abstand von je 3 Tagen je 3,0 ml gepackte Erythrozyten zu injizieren. Die Auswertung wurde 7 Tage nach der letzten Injektion vorgenommen. Die Titer betrugen 1 : 1000 bis 1 : 2000.

Die "Arbeitsanweisung für die Blutuntersuchung ..." (27) des HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamtes Berlin bedient sich der gleichen Methode. Sie schlägt vor, am

1. Tag 1. Injektion 4,0 ml gepackte Schaferythrozyten
4. Tag 2. Injektion 3,0 ml gepackte Schaferythrozyten
7. Tag 3. Injektion 1,0 ml gepackte Schaferythrozyten

zu injizieren. Es wird als Grenztiter die Verdünnungsstufe gewertet, die eine völlige Auflösung der roten Blutkörperchen bewirkt, und gefordert, daß ein brauchbarer Ambozeptor mindestens die Verdünnungsstufe 1:1 600 erreicht. Eine Reihe von Autoren zieht Injektionen in fallenden Erythrozytendosen vor. Von HALLMANN (23) wird folgendes Injektionsschema angegeben:

1.Tag 1.Injektion 2,0 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
5.Tag 2.Injektion 1,5 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
11.Tag 3.Injektion 1,0 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
16. - 18. Tag Auswertung des Serums.

Als Minimum wird ein Titer von 1 : 2000 angegeben.

LEIPERT, PIRINGER und PILGERTORFER (36) schlagen vor, am

1. Tag 1. Injektion 1,50 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
5. Tag 2. Injektion 1,25 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
9. Tag 3. Injektion 1,00 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
13. Tag 4. Injektion 0,75 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.
17. Tag 5. Injektion 0,50 ml gepackte Hammelerythrozyten i.v.

zu injizieren.

Bei dieser Methode wurden Titer von 1 : 3000 und mehr erzielt.

Das mehrmalige Injizieren von roten Blutkörperchen kann anaphylaktische Erscheinungen, die eventuell zum letalen Schock führen, hervorrufen. Dabei beobachtet man während des Injizierens ein Verdrehen der Augen als frühestes Symptom. Der Blick wird starr, die Atmung angestrengt, die Herzfrequenz steigt an. Schließlich werden die

Kaninchen apathisch oder öfter von klonischen Krämpfen befallen. Dieser Zustand kann zu einem sofortigen Tod führen oder sich über Tage hinziehen und dann mit dem Tode enden. Bei leichten Erscheinungen tritt nach einigen Stunden Genesung ein.

DOERR (14) versuchte, die Zusammenhänge bei der Anaphylaxie zu klären. Durch anaphylaktische Noxen kommt es nach DOERR zur Reizung der glatten Muskelfasern und Gefäßendothelien. Diese Phase entspricht einer Parasympatikusreizung und wird im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Ag.-Ak.-R.) gedeutet. Nach DOERR gibt es für die Reizung drei Möglichkeiten einer Erklärung:

"1) Die Zelle enthält das Antigen, der Antikörper tritt plötzlich in der Umgebungsflüssigkeit auf;
2) Die Zelle enthält Antikörper und das Antigen erscheint im Milieu;
3) Die Zelle enthält weder Antigen noch Antikörper; beide Komponenten werden extrazellulär zur Reaktion gebracht."

Die zuletzt erwähnte Hypothese konnte durch Versuche ausgeschlossen werden. Es wurde daher auf Grund der pathologischen Befunde eine Zellschädigung angenommen. DALE (12) deutet diese Zellschädigung mit einer Neubildung eines Giftstoffes, der durch intra- oder extrazelluläre Proteolyse entsteht. Wegen der außerordentlich kurzen Latenzzeit war DOERR der Ansicht, daß die Reaktion an der Zelloberfläche (Membranhypothese) ablaufen würde. Andere Meinungen besagen, daß die Reaktion in der Blutbahn vor sich geht, wobei die Gefäßendothelien durch ausgeflockte Eiweißpartikel geschädigt werden. Auch ist eine Histaminausschüttung, die durch die infolge der Ag.-Ak.-Reaktion gereizten Zellen ausgelöst wird, als Ursache für den Schock in Betracht gezogen worden. Es ergeben sich aber wesentliche Unterschiede zwischen Histaminschock und anaphylaktischem Schock. Die Histamin-Theorie ist daher nicht allgemein anerkannt worden. Bei intracutaner Injektion

sind lokale Erscheinungen nicht selten. Sie werden als sog. Arthus-Phänomen aufgefaßt. FISCHER (18) zeigte an Meerschweinchen, die durch subcutane Injektionen sensibilisiert worden waren, daß bereits intravenöse Gaben von 0,01 ml einen letalen Schock hervorrufen können. Dabei sind freie Antikörper im Blut keineswegs regelmäßig nachweisbar. Viele Autoren bemühten sich, durch Änderung der Injektionsschemata Verluste durch anaphylaktische Erscheinungen zu vermeiden.

BOYD (9) versuchte durch intraabdominale Injektionen, die er in sein Versuchsschema einbaute, Anaphylaxien auszuschließen. ULRICH und MC ARTHUR (54) spritzten vor der 3., 4. und 5. Injektion je 0,2 ml Serum s.c. und vor der 7., 8. und 9. die gleiche Menge Erythrozyten-Suspension i.v. und injizierten erst 30 Min. später die restliche Menge. Sie wollen durch dieses Vorspritzen die Tiere vorübergehend desensibilisieren. KOSCHUCHAROFF (30) wendete Antihistaminpräparate vor den intravenösen Injektionen von Hammelblut an, um anaphylaktische Erscheinungen zu verhindern. Der Autor injizierte am 1., 3., 7., 10., 15., 20. und 30. Tage je 1,0 ml Hammelblut i.v. und spritzte 2 - 3 Min. vor jeder Injektion 2,0 ml des 1 : 10 verdünnten Antistin "CIBA". Mit dieser Methode wurden maximale Titer in Höhe von 1 : 6 400 erzielt. Von dem Sachbearbeiter der Behring-Werke (4) konnten die Ergebnisse Koschucharoffs nicht bestätigt werden.

RUGE (43) weist darauf hin, daß sich anaphylaktische Erscheinungen auch ohne Antihistamin vermeiden lassen. Er hält die Methode von ULRICH und MC ARTHUR (54) für erfolgreicher. In vergleichenden Untersuchungen von THELMA und Mitarbeiter (53) werden 5 verschiedene Methoden, die z.T. in amerikanischen Laboratorien üblich sind, beschrieben, wobei als beste Methode die von ULRICH und MC ARTHUR bezeichnet wird.

ULRICH und MC ARTHUR injizierten Kaninchen mit steigenden Dosen und bedienen sich folgenden Schemas:

1. Tag	1. Injektion	0,5 ml Serum s.c.
3. Tag	2. Injektion	1,0 ml Serum s.c.
5. Tag	3. Injektion	0,2 ml Serum s.c. vorinjizieren
		1,3 ml Serum s.c. 30 Min. danach
7. Tag	4. Injektion	0,2 ml Serum s.c. vorinjizieren
		1,8 ml Serum s.c. 30 Min. danach
9. Tag	5. Injektion	0,2 ml Serum s.c. vorinjizieren
		2,3 ml Serum s.c. 30 Min. danach
4 Tage Pause		
13. Tag	6. Injektion	1,0 ml Schafzellensuspension 10%ig i.v.
15. Tag	7. Injektion	0,2 ml Erythrozyten-Suspension i.v. vorinjizieren
		1,3 ml Erythrozyten-Suspension i.v. 30 Minuten danach
17. Tag	8. Injektion	0,2 ml Erythrozyten-Suspension i.v. vorinjizieren
		2,3 ml Erythrozyten-Suspension i.v. 30 Minuten danach
19. Tag	9. Injektion	0,2 ml Erythrozyten-Suspension i.v. vorinjizieren
		2,8 ml Erythrozyten-Suspension i.v. 30 Minuten danach

Am 26. Tag wird die Auswertung vorgenommen. Die Autoren geben an, daß bei anfänglichen intravenösen Sensibilisierungen keine höhere Titer erreicht wurden und deswegen die subcutanen Injektionen, als einfacher zu handhaben, vorzuziehen seien. Es wurden Titer von 1 : 10 000 bis 1 : 20 000 erzielt. Die Methode der Titerbestimmung wurde nicht näher erläutert.

BOYD (9) hat durch zwei intravenöse Injektionen und eine intraabdominale Injektion im Abstand von 6 bis 8 Tagen 10 Tage nach der letzten Injektion einen Titer von über 1 : 4000 erzielt. BOYD gab außerdem in den ersten 3 Tagen der ersten Woche je 1 Injektion intravenös und in den ersten 3 Tagen der folgenden drei Wochen 1 Injektion intraabdominal und 2 Injektionen intravenös. Die Auswertung erfolgte 1 Woche nach der letzten Injektion. Beide Methoden hatten gleich gute Ergebnisse. Für alle Injektionen wurde

eine 30%ige Schaf-Erythrozyten-Suspension verwendet. Welche Mengen der Suspension injiziert wurden, ist nicht angegeben worden.

Die intraabdominalen Injektionen sollen geeignet sein, anaphylaktische Reaktionen zu vermeiden.

SAWYER und BOURKE (48) vermuten, daß die anaphylaktischen Erscheinungen durch das Hämoglobin der Erythrozyten hervorgerufen werden. Deshalb übernahmen sie die Anregung von VEDDER und HADJOPOULOS und verwenden zum Hämolysieren der Erythrozyten 0,4%ige NaCl-Lösung. Da hierbei die Ausbeute zu gering war, schlugen SAWYER und BOURKE vor, mit hämolytischem Ambozeptor und Komplement zu hämolysieren. Sie gewannen mit dieser Hämolyseart doppelt soviel Zellstroma und gaben folgendes Schema für die Injektion an:

1) Zu 1,0 ml gewaschenen und gepackten Schaferythrozyten 1,0 ml Komplement und 0,3 ml unverdünnten Ambozeptor,
2) 15 Minuten bei 37°C incubieren,
3) Mit physiologischer NaCl-Lösung auf 15 ml auffüllen und durch zweimaliges vorsichtiges Umkippen mischen,
4) 5 Minuten zentrifugieren,
5) Überstand abhebern und aufheben,
6) 15 ml physiologischer NaCl -Lösung dazugeben, vorsichtig mischen und den Überstand von 5) dazugeben (dadurch wird die unvollständige Hämolyse zu Ende geführt.),
7) in einer schnellaufenden Zentrifuge 30 Min. zentrifugieren (da keine Umdrehungszahl angegeben wurde, ist von uns mit 3000 UpM zentrifugiert worden),
8) Überstand abhebern und verwerfen,
9) 15 ml physiologische NaCl-Lösung dazugeben und vorsichtig mischen, um restliches Komplement und Ambozeptor auszuwaschen. Anschließend 30 Min. zentrifugieren,
10) Überstand abhebern und verwerfen,
11) Das gepackte, hellrosafarbene Zentrifugat (Zellstroma) auf 1,0 ml mit physiologischer NaCl-Lösung auffüllen.

Diese Menge stellt die erste Dosis für 1 Kaninchen dar. Die zweite Dosis von 2,0 ml soll am 5. Tage und die dritte von 3,0 ml am 10. Tage injiziert werden. Da schon nach der zweiten Injektion ein Titer von 1 : 4000 bis

1 : 10 000 zu erwarten ist, erübrigt sich meist eine dritte Injektion. Über die Auswertungsmethode des Ambozeptors wurden keine Angaben gemacht. Die Verfasser heben hervor, daß bei 500 im Laufe der Jahre verwendeten Kaninchen keines anaphylaktische Erscheinungen gezeigt habe. Die Gewinnung eines hochwertigen Ambozeptors bereits nach 10 Tagen läßt die relativ mühsame Stromaherstellung nicht ins Gewicht fallen.

BECKER (3) vergleicht folgende 5 Methoden, gibt dabei aber keine genauen Injektionsdaten an.

Methode 1) i.v. gleichbleibende Dosen Hammelerythrozyten 3 - 4 x je Woche

Methode 2) i.p. gleichbleibende Dosen Hammelerythrozyten 3 - 4 x je Woche

Methode 3) i.v. gleichbleibende Dosen Hammelerythrozyten in fallenden Intervallen

Methode 4) i.v. steigende Dosen Hammelerythrozyten in steigenden Intervallen

Methode 5) i.v. steigende Dosen Hammelerythrozyten in fallenden Intervallen

Die mit den 5 Methoden erzielten Ergebnisse sind aus Tabelle I ersichtlich.

Tabelle I (in Prozent der verwendeten Kaninchen)

Methode	Todesfälle	Titer unter 1 : 1000	Titer über 1 : 2000	Versuchsdauer in Tagen
1	22	22	56	35
2	60	10	30	60
3	24	13	63	20
4	4	0	96	17
5	9	9	82	15

Bei der i. p. Methode (2.) treten demnach die meisten Todesfälle auf und erreichen die wenigsten Tiere den Titer von

über 1 : 2000. Die 4. Methode mit steigenden Intervallen und steigenden i.v. injizierten Dosen ergab bei 100 benutzten Tieren 96 mal Titer von über 1 : 2000. Nur 4 Kaninchen wurden eingebüßt. THELMA und Mitarbeiter (53) haben neben den Methoden von ULRICH und MC ARTHUR sowie SAWYER und BOURKE noch drei weitere Methoden geprüft, die in von den Verfassern nicht weiter bezeichneten Laboratorien angewendet wurden. Die Schemata wurden nicht veröffentlicht und sind daher vielleicht nicht besser als die bereits bekannten.

In den Tabellen II und III sind die Injektionsschemata und Ergebnisse der verschiedenen von THELMA und Mitarbeitern benutzten Injektionsarten einander gegenübergestellt. Ein Titervergleich der Ergebnisse von THELMA und Mitarbeitern mit denen anderer Autoren ist leider nicht möglich, weil die Seren nicht nach der Kolmer-Methode, sondern nach einer eigenen Methode ausgewertet wurden. Aus den Tabellen geht hervor, daß die Methoden 1 und 3 die niedrigsten und die Methoden 4 und 5 die höchsten Titer erzielten. Das Schema nach ULRICH und MC ARTHUR (Methode 5) wurde durch die Verfasser insofern abgewandelt, als das Serum i.v. injiziert wurde und die Erythrozytendosen erhöht wurden. Weiter haben die Verfasser die Methode modifiziert, indem sie einen Teil der Tiere mit Blut von nur einem Schaf und den anderen Teil mit dem Erythrozytengemisch mehrerer Schafe sensibilisierten. Die mit diesem Mischblut behandelten Tiere erreichten einen höheren Titer als die mit den Erythrozyten nur eines Schafes immunisierten Tiere (s. Tab. III).

Tabelle II

INJEKTIONSMETHODEN VON THELMA und Mitarbeitern (53)

Methode	Injektionsart	Antigen	Tag der Immunisation/Dosis in ml*						Tag des Entblutens
1	i.v.	Zellstroma	1/1,0	5/2,0	10/3,0				15
2	per os	50% Erythr.-Suspension:	1/2,5	3/2,5	5/2,5	danach			
	i.v.	2,0 ml gepackte Erythrozyten :	6/1:6	1o/1:8	14/1:5;3	18/1:4	22/1:3	26/1:2	31
3	i.v.	gepackte Erythrozyten in 5,0 ml	1/0,125	4/0,25	8/0,25	10/0,375			15
4	s.c.	Gesamtblut	1/1,0	3/1,0	5/1,5	7/2,0	9/2,5	danach	21
	i.v.	20% Erythr. Suspension	12/1,0	15/1,0	18/1,0				
5	i.v.	Serum	1/0,5	3/1,0	5/1,5+	7/2,0+	9/2,5+	danach	25
		10% Erythr.-Suspension	14/1,0	16/2,0+	18/3,0+	20/4,0+			

*) ausgenommen bei Methode 2, wo Konzentration und Volumen der einzelnen Injektionen gleich sind und die Verdünnungen angegeben sind.

+) davon werden 0,2 ml 30 Minuten vor der Hauptdosis injiziert.

Tabelle III

Vergleiche der durch 5 Methoden von THELMA und Mitarbeitern erzielten Ergebnisse

Methode	Zahl der immunis. Kaninchen	Ausbeute von Serum mit dem Titer 1:250 oder höher in % der Tiere	%-Zahl der Kaninchen mit folgendem Titer (reziproker Wert der Verdünnung) 250 - 400	500 - 800	1000 - 2500
1	14	15 %	13 %	-	-
2	9	77 %	77 %	-	-
3	94	34 %	23 %	11	-
4	15	87 %	13 %	53	20
5	21^{+}	100^{+}%	24^{+}%	67^{+}	9^{+}
	$53^{ø}$	$100^{ø}$%	$15^{ø}$%	$43^{ø}$	$42^{ø}$

+) Immunisierende Dosis bestehend aus Blutkörperchen eines einzelnen Schafes.

ø) Immunisierende Dosis bestehend aus dem Erythrozytengemisch mehrerer Schafe.

Wie unterschiedlich die Meinungen über die besten Sensibilisierungsverfahren sind, geht aus den Untersuchungen von BOROWSKAJA (8) hervor. Die Autorin stellt fest, daß "teils gute, teils schlechte Resultate" erzielt wurden, "so daß es keine Methode gibt, die ein sicheres Gelingen der Immunisation gewährleistet". Möglicherweise spielen bisher nicht bekannte Faktoren bei der Ambozeptorbildung noch eine Rolle. SEZARY (51) schreibt, daß bei gleicher Gesamtmenge, eine hohe aber einmalige Dosis von Hammelblutkörperchen i.p. injiziert, eine stärkere Antikörperbildung bewirkt als 3 kleine Dosen. Dagegen erklärt RUBINSTEIN (41), daß mehrere kleine Dosen einen hochwertigeren Titer erzeugen als eine einmalige große Dosis mit der gesamten Blutmenge.

Mögliche Einflüsse von außen wurden als Faktoren, die auf die Antikörperbildung wirken können, auch in Betracht gezogen. Von allen Autoren, die über Alter und Gewicht der Kaninchen Angaben gemacht haben (48, 53, 54, 36), werden junge, aber ausgewachsene Kaninchen von etwa 2 - 3 kg Körpergewicht für die Ambozeptorgewinnung bevorzugt. Während ULRICH und MC ARTHUR sowie LEIPERT und Mitarbeiter (36) besonderen Wert auf nur männliche Kaninchen legten, betonen SAWYER und BOURKE, daß sie bei weiblichen wie männlichen Tieren die gleichen Versuchsergebnisse erzielten. Die beiden letzten Autoren halten auch die Rassenzugehörigkeit für bedeutungslos. Fest steht, daß die individuellen Unterschiede bei den Kaninchen auf die Titerhöhe einen wesentlichen Einfluß haben. VASSILJEVA (55), SACHS (45), BOROWSKAJA (8) und RUBINSTEIN (41) äußern sich in dieser Richtung. THELMA und Mitarbeiter (53) wollen mit allen Kaninchen gute Ergebnisse mit der von ihnen modifizierten Methode nach ULRICH und MC ARTHUR erzielt haben.

ZÖLLNER (58) untersuchte die Antikörperbildung bei extrem eiweiß- und fettarm ernährten Kaninchen. Er verwendete zwei Gruppen von je 6 Kaninchen. In der ersten, mangelhaft ernährten Gruppe trat ein Gewichtsverlust von ca. 300 g je Tier in 8 Wochen ein. Die 2. Gruppe wurde normal

ernährt und blieb ungefähr im Gewicht konstant. Nach 12 Wochen wurden alle Tiere gegen rote Hammelblutkörperchen sensibilisiert. Die 6 eiweißarm ernährten Kaninchen bildeten 3 mal einen Titer von 1 : 6 400 und 3 mal 1 : 3 200. Die normal ernährten hatten einen Titer von 2 mal 1 : 6 400, 3 mal 3 200 und 1 mal 1 : 1 600. Aus den Versuchen ist zu ersehen, daß eine Zeit von 12 Wochen nicht ausreicht, um bei eiweiß- und fettarmer Fütterung die Antikörperbildung ungünstig zu beeinflussen.

LÜHRS (37) stellte fest, daß bei saurer Fütterung (Hafer) die Globuline das Kompelment und bei alkalischer (Grünfutter) dagegen die Haemolysine aktivieren. LAUBENHEIMER und VOLLMAR (34) vermochten durch Ausfällen der Euglobuline mittels der Elektro-Ultra-Filtration nach BECHOLD und ROSENBERG (2) und einem anschließenden Auflösen in physiologischer NaCl-Lösung den Titer um 1/2 bis 1 Stufe zu erhöhen. Die Euglobulinfällung nach anderen Fällungsmethoden zog einen Titerverlust nach sich. WALBUM und SCHMIDT (56) stellten fest, daß Manganchlortr in 0,001 molarer Lösung 1,0 ml/kg Körpergewicht zur Zeit des Wiederabfallens des Ambozeptortiters i.v. injiziert einen steigernden Einfluß auf die Ambozeptorbildung hat. Bei ca. 80 % aller Kaninchen trat eine Titererhöhung um 28 % 2 Stunden nach der Injektion ein. Nach 10 Stunden fielen die Titer wieder auf ihre ursprüngliche Höhe ab.
H. SCHMIDT (49) konnte bei seinen Untersuchungen keine Erhöhung des Ambozeptortiters durch $MnCl_2$ feststellen. Es gelang ihm nur, den Titer von Diphtherie- und Tetanusantitoxin sowie den Agglutinationstiter von mit Typhus und Pneumokokken behandelten Kaninchen zu steigern.

Bei der Klärung der serologischen Phänomene sind mehrere Autoren auf unspezifische Reaktionsabläufe, die mit Haemolyseerscheinungen zusammenhingen, aufmerksam geworden. FORSSMANN (20) entdeckte beispielsweise das nach ihm benannte Forssmann-Antigen (F.Ag.). Er injizierte einem Kaninchen Meerschweinchennierenzellen und stellte fest, daß sich Haemolysine bildeten, die Hammelerythrozyten

auflösten. Seitdem werden Stoffe, die nach Injektion bei Kaninchen Hammelerythrozyten-Lysine erzeugen, Forssmann-Antigene genannt. Eine Anzahl derartiger Antigene sind von FORSSMANN (21) beschrieben worden. Diese Haemolysine haben für die KBR jedoch keine Bedeutung.

Von JAKOBSTHAL und SCHUBACK (28) wurden im Kaninchenserum Normalhaemolysine gegen Hammelerythrozyten und auch gegen rote Blutkörperchen anderer Tierarten entdeckt. Diese Lysine können unvorhergesehene Zwischenfälle hervorrufen, wenn sie im Organismus ihre Wirkung zur Geltung bringen. Titerunterschiede können schließlich noch durch die verschiedene Behandlung der für die Reaktion notwendigen Reagenzien verursacht werden.

Die Reinigung der Glasröhrchen im alkalischen Milieu kann nach HALLMANN (23) das Ergebnis der KBR nach der negativen Seite hin beeinflussen. DOLD und GROSS (15) teilen ferner mit, daß die Schafe, die zur Gewinnung der roten Blutkörperchen dienen, für die Wirksamkeit des haemolytischen Ambozeptors und den Ausfall der KBR, eine wesentliche Rolle spielen, eine Auffassung,die auch von dem Sachbearbeiter der Behring-Werke vertreten wird. Blutkörperchen-Suspensionen, die von wiederholt punktierten Schafen stammen, sollen beispielsweise haemolyseresistenter sein als die von jungen noch nicht zur Blutentnahme benutzten Tieren. Bei einem Vergleich der Reaktionsergebnisse betrug der Unterschied bis zu 4 Titerstufen. Der Sachbearbeiter der Behring-Werke meinte, daß es vorteilhaft ist, für die Ambozeptorgewinnung die Blutkörperchen eines bestimmten Schafes zu verwenden, das bereits seine Eignung für die Ambozeptorgewinnung gezeigt hat. DOLD und GROSS untersuchten auch den Einfluß des Defibrinierens durch Schütteln mit Glasperlen. Sie stellten fest, daß 30 Minuten lang geschütteltes Blut bedeutend weniger gegen Haemolysine resistent ist als 5 Minuten lang geschütteltes. Das in verschieden langen Zeiten geschüttelte Blut ergab bei gleichem Ambozeptor, gleichem Komplement und

gleichem Antigen einen Titerunterschied von 3 - 5 Stufen. Weiter stellten die Verfasser fest, daß das an den Blutkörperchen bei ungenügendem Waschen verbleibende Fibrin den haemolytischen Ambozeptor bindet und einen Titerverlust bewirken kann. Selbst die Lösungsmittel haben einen Einfluß auf die Reaktion. Die KBR mit gepufferter NaCl-Lösung ergibt höhere Titer als mit ungepufferter. Da bei Massenuntersuchungen aus wirtschaftlichen Gründen ausschließlich ungepufferte NaCl-Lösung verwendet wird, sind Fehler bei Titervergleichen verschiedener Untersuchungen wohl kaum zu befürchten.

Jeder Untersucher wird sich bemühen, die gleiche Technik einzuhalten und Einflüsse auszuschalten, die das Ergebnis der KBR nachteilig beeinflussen können. Trotzdem muß ein gewisser Vorbehalt immer gemacht werden, wenn die Ergebnisse verschiedener Untersucher, wie es auch in vorliegender Arbeit erforderlich ist, miteinander verglichen werden.

III. Eigene Versuche

Im Vordergrund der Arbeit stand die Frage, ob mit der von ULRICH und MC ARTHUR empfohlenen Methode bei den für die Gewinnung von haemolytischem Ambozeptor verwendeten Kaninchen anaphylaktische Erscheinungen vermieden werden können.

In 5 einzelnen Versuchen einer Versuchsreihe (Versuchsreihe 1), bei denen die für die Erythrozyten- und Serumgewinnung dienenden Schafe gewechselt wurden, sollte geprüft werden, ob diese Methode einerseits Verluste durch anaphylaktische Erscheinungen ausschaltet und andererseits hochwertige haemolytische Seren erzielt.

Da die Erwartungen an die Methode von ULRICH und MC ARTHUR möglicherweise enttäuscht werden konnten, war vorgesehen, in gesonderten Versuchsreihen festzustellen, was unter gleichen Versuchsbedingungen die Methoden von SAWYER und BOURKE (Versuchsreihe 2), die des Heeresveterinär-Untersuchungsamtes kombiniert mit dem Vorschlag von KOSCHUCHAROFF, Antihistamin zur Verminderung von Anaphylaxie zu verwenden (Versuchsreihe 3) und die von DARTER vorgeschlagene kombinierte intracutane und intravenöse Injektion der Erythrozyten-Suspensionen (Versuchsreihe 4) zu leisten vermögen.

1. Material

Zur Gewinnung roter Schafblutkörperchen wurden die Institutsschafe, bei denen es sich um eine Kreuzung von Karakulschaf und deutschem Weideschaf handelt, verwendet. Die Schafe waren mehrere Jahre alt, wiederholt zur Blutentnahme benutzt und in gutem Futterzustand. Sie wurden im Winter mit Heu, im Sommer mit Grünfutter gefüttert und erhielten pro Tier und Tag etwa 400 g Hafer und 1 200 g Trockenschnitzel. Den Tieren stand ein Auslauf ohne Weidemöglichkeit zur Verfügung. Krankheiten wurden während des Versuchszeitraumes nicht beobachtet.

Für die Gewinnung des haemolytischen Ambozeptors dienten Kaninchen aus der Institutszucht. Die Tiere waren aus Kreuzungen der Rasse Chinchilla und deutsche Riesen hervorgegangen und wurden im Freien in 6-teiligen Holzställen in Einzelboxen gehalten. Als Einstreu wurden Stroh und Heu benutzt. Das Futter bestand aus Heu, etwa 100 g "Kanin"-Standardfutter, dazu wurden etwa 30 g Hafer und ca 200 g frische Futterzuckerrüben je Kaninchen gegeben. Die Tiere waren im Durchschnitt 4 000 g schwer und 6 - 10 Monate alt. Sie waren frei von klinisch nachweisbaren Krankheiten.

Männliche etwa ein Jahr alte Meerschweinchen lieferten das Komplement. Die Tiere wogen durchschnittlich 400 g und erhielten "Kanin"-Standardfutter, dazu etwa 10 g Hafer, im Herbst und Winter 100 g frische Futterzuckerrüben und im Sommer Grünfutter.

2. Technik

Gewinnung und Behandlung der Schaferythrozyten.

Schafblut wurde aus der Vena jugularis mit einer Blutentnahmehohlnadel (Stärke 2,3 mm) entnommen. Die Punktionsstelle wurde vorher von der Wolle befreit und dann mit 70%igem Alkohol gesäubert. Nach dem Einstechen lief das Blut ohne Zwischenstück in das Auffanggefäß einer sterilen Flasche. Das Blut wurde je nach Verwendungszweck entweder in Na-Citrat (3,8%ig) oder in Schüttelkolben mit Glasperlen aufgefangen. Im letzteren Falle wurde es 10 Minuten lang durch mäßiges Schütteln defibriniert (15) und anschließend durch entfettete, sterile Watte gegeben, um ausgeschüttelte Fibrinbestandteile zu beseitigen. Danach wurde es bei 2 500 UpM 10 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch physiologische Kochsalz (=NaCl)-Lösung ersetzt. Nach Aufwirbeln des Sediments und gutem Mischen wurde nochmals zentrifugiert. Dieses Waschen wurde solange wiederholt,

bis der Überstand vollkommen klar war. In der Regel wurde 3 mal gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes bleiben die gepackten Erythrozyten übrig. Sie wurden, wie auch die aus dem Citratblut gewonnenen roten Blutkörperchen, im Kühlschrank bei 4° bis 6° C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Gewinnung und Behandlung des Komplementes.

Die zur Gewinnung von Komplement dienenden Meerschweinchen wurden von einer Hilfsperson auf den Rücken gelegt und bei Fixieren der Gliedmaßen gestreckt gehalten. Die linke Brustseite in Nähe des Sternums wurde mit Alkohol desinfiziert. Dann wurde an der Stelle des am stärksten fühlbaren Herzschlages (etwa zwischen den beiden letzten Rippen oder caudal der letzten) in craniomedialer Richtung mit der Kanüle (Nr. 12), der eine 5 ml Injektionsspritze aufgesetzt worden war, eingestochen (1, 22, 33, 39). Bei gezieltem Stich konnten 4 - 5 ml je Tier durch leichten Stempelzug der Spritze entnommen werden. Das Blut wurde gleich nach der Entnahme in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Blutersatzmittel wurden den gebluteten Tieren nicht injiziert. Nach dem Gerinnen des Blutes wurde das Gerinsel mit einem Glasstab vorsichtig von der Röhrchenwand gelöst und durch 10 Minuten langes zentrifugieren bei 2 500 - 3 000 UpM vom Serum getrennt. Das Serum wurde abpipettiert, im Kühlschrank aufbewahrt und diente als frisches Komplement.

Zur Konservierung (11, 16, 19, 21, 23, 42) reichten die Mengen nicht aus. Es wurden daher für jeden Versuchsansatz stets frisch entnommenes Komplement verwendet. Die längste Zeit der Aufbewahrung im Kühlschrank betrug 2 Tage.

Injektionsarten

Die Sensibilisierung der Kaninchen wurde je nach den Erfordernissen der verschiedenen Techniken durch intra-

venöse, subcutane oder intracutane Injektion von Schafblut durchgeführt. Bei der intravenösen Injektion wurde in die Randohrvene injiziert, nachdem an der Injektionsstelle die Haare mit Daumen und Zeigefinger ausgezupft worden waren. Die Kanüle Nr. 12 erwies sich für die Injektionen als besonders gut geeignet. Vor den Injektionen wurde stets darauf geachtet, daß keine Luft in dem Spritzenzylinder war, so daß Luftembolien vermieden werden konnten.

Gewinnung des Ambozeptors

Die Blutentnahme für die Auswertung des haemolytischen Ambozeptors erfolgte beim Kaninchen ebenfalls aus der Randohrvene oder aus der mittleren Ohrarterie, wobei das Blut oberhalb der Einstichstelle mit der Hand gestaut werden mußte, um ein Nachbluten zu vermeiden. Bei kaltem Wetter erwies sich als zweckmäßig, die Tiere 2 Stunden vor der Entnahme zur Erweiterung der Venen in einen geheizten Raum zu bringen.

Die subcutanen Injektionen wurden an tiefliegenden Körperstellen vorgenommen, damit im Falle einer Abszeßbildung der Herd gespalten werden und der entzündliche Prozeß sich nicht ausdehnen konnte. Vor dem Injizieren wurde eine Hautfalte gebildet und quer zu dieser tief unter die Haut gestochen, so daß nach der Injektion kaum eine Quaddel zu fühlen war.

Vor dem intracutanen Injizieren wurde eine ca. 3 x 3 cm große Hautstelle auf dem Rücken durch Rasieren von den Haaren befreit. Nach Erfassen einer Hautfalte wurde in Längsrichtung flach in die Haut eingestochen und unter leichtem Druck die Injektionsflüssigkeit eingebracht. Es bildete sich hier schon bei einer geringen Menge von ca. 0,1 ml eine deutliche Quaddel, die die dunkelrote Farbe

der injizierten Flüssigkeit annahm. Die Menge, die bei jedem Tier injiziert werden konnte, war individuell verschieden und schwankte zwischen 0,5 und 2,0 ml pro Injektionsstelle. Trat blutige Flüssigkeit aus den Poren, wurde an einer benachbarten Stelle ein neuer Einstich vollzogen, um ein Platzen der Haut zu vermeiden.

Auswertung des Ambozeptors

Auf eine vorherige Auswertung des Komplementes wurde bei der Ambozeptorauswertung verzichtet. Das Komplement wurde stets 10%ig in einer Menge von 0,5 ml, also im Überschuß, verwendet. Eine Komplementkontrolle (ohne Ambozeptor) lief stets mit. Das zur Probetitrierung aus den Ohrgefäßen entnommene Blut wurde in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bis zur vollständigen Gerinnung bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wurde das Gerinsel von der Glaswand gelöst und das Serum nach Zentrifugieren (10 Minuten bei 3 000 UpM) abpipettiert. Es stellte den haemolytischen Ambozeptor dar und wurde zur Inaktivierung eventuell vorhandenen Komplementes 30 Minuten lang bei 56°C erwärmt. Eine Konservierung (6,52) war bei den geringen Mengen nicht erforderlich. Die Titration des Ambozeptors wurde nach der Vorschrift des Heeres-Veterinäramtes (27) oder nach der KOLMER-Methode (29) durchgeführt. Die beiden Methoden unterschieden sich nur dadurch, daß bei der Kolmer-Methode 0,3 ml des 1 : 10 verdünnten Komplementes für die Ambozeptorauswertung statt 0,5 ml bei der anderen üblichen Auswertung verwendet werden. Als Reaktionszeit gibt KOLMER 1 Stunde bei 37°C an, während in der für unsere Auswertungen zu Grunde gelegten Methode 20 Minuten bei 37°C vorgesehen sind.

Die Titration des Ambozeptors vollzog sich folgendermaßen:
In den Röhrchen 1 - 6 werden zur Verdünnung des Ambozeptors 0,5 ml Kochsalz-Lösung vorgelegt, desgleichen in Röhrchen 7 und 8. Zu Röhrchen 1 wird 0,5 ml des 1 : 100 mit physiologischer NaCl-Lösung Ambozeptors gegeben. Nach sorgsamem Mischen werden 0,5 ml in Röhrchen 2 überpipettiert. In gleicher Weise wird von Röhrchen 2 bis Röhrchen 6 verfahren. Aus Röhrchen 6 werden 0,5 ml des Gemisches verworfen. Danach wird in jedes Röhrchen 1,0 ml physiologischer NaCl-Lösung gegeben. Diese Menge dient als Ersatz für die im Hauptversuch verwendeten Mengen von 0,5 ml des 1: 4 verdünnten Patientenserums und von 0,5 ml des spezifischen Antigens, damit die Gesamtflüssigkeitsmenge von 2,5 ml erfüllt wird. In jedes Röhrchen werden 0,5 ml des 10%igen Komplementes und 0,5 ml einer 3%igen Hammelblutkörperchen-Suspension zugegeben. Röhrchen 7 (ohne Komplement) und 8 (ohne Ambozeptor) dienen als Ambozeptor- und Komplementkontrolle, um unspezifisches Haemolysen bei Gemischen von Ambozeptor- und Blutkörperchen einerseits und von Komplement und Blutkörperchen andererseits erkennen zu können. In dem nachstehenden Schema ist der Gang der Titrierung des Ambozeptors dargestellt:

Vereinfachte Auswertung ohne Antigen und ohne positives und negatives Serum

Röhrchen	1	2	3	4	5	6	7	8
Ambozeptor 1 : 100	0,5	→	→	→	→	→	0,5	
NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10% Kompl.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		0,5
3% Hämk.Susp.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Verdünnung 1:	200	400	800	1600	3200	6400		

Einwände gegen die vereinfachte Methode der Auswertung sind durchaus möglich, und es ist richtig, daß man bei der Auswertung auf ein positives und negatives Patientenserum sowie auf ein spezifisches Antigen nicht verzichten sollte. Uns ging es bei der Fragestellung aber nur um die Wirksamkeit des haemolytischen Ambozeptors, und wir glaubten am ehesten vergleichbare Werte zu erlangen, wenn wir die infektions-spezifischen Komponenten wegfallen lassen würden. Außerdem sollte ein nicht unbedingt erforderlicher Verbrauch von beispielsweise brucellose-positivem Serum und Brucella-Antigen vermieden werden.

Die in dem Schema dargestellte Verdünnungsreihe kann je nach Bedarf erweitert werden. Die Bestimmung eines eventuell vorhandenen Normaltiters erfolgte mit unverdünntem und 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 usw. mit NaCl-Lösung verdünntem Serum. Parallel zu jeder Ambozeptorauswertung wurde zur Kontrolle ein glycerinstabilisierter Ambozeptor der Behring-Werke mit dem Titer 1 : 4000 ausgewertet. Der Kontrollambozeptor wurde im Kühlschrank bei 4° - 6°C aufbewahrt. Die Reaktion war in der Regel nach 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C beendet, in einigen Fällen wurde bei unklarem Ergebnis nach 30 Minuten abgelesen.

Entbluten

Bei einem befriedigendem Ergebnis der Auswertung erfolgte das Entbluten des Kaninchens in Aethernarkose. Die ventrale Halspartie wurde über der Carotis mit einem Rasiermesser nach Einseifen rasiert, um dann die Blutgefäße nach einem Hautschnitt stumpf frei zu präparieren. Nach Fixieren des Tieres mit dem Kopf nach unten wurde die Carotis über einem weiten Meßzylinder durchschnitten (33). Teilweise haben wir die Kaninchen auch nach Genickschlag durch Halsschnitt in ein steriles Glasgefäß entblutet.

3. Ergebnisse

1. Versuchsreihe, Methode nach ULRICH und MC ARTHUR (54)

Wie im Literaturabschnitt näher erläutert wurde, soll die Methode eine Desensibilisierung der Kaninchen herbeiführen, so daß Verluste beim Nachimmunisieren mit roten Schafblutkörperchen nicht eintreten. Die Desensibilisierung erfolgt durch Vorspritzen von Schafserum bzw. Schaferythrozyten-Suspension. Das Immunisierungsschema ist auf Seite 10 angegeben.

1. Versuch

Von einem Schaf wurde soviel Blut genommen, daß das gewonnene Serum für die 5 sensibilisierenden Injektionen von 3 Kaninchen ausreichte. 3 Kaninchenböcke im Gewicht von 3350 g (Nr. 1), 3490 g (Nr. 2) und 3300 g (Nr. 3) wurden am 10.9.64 in den Versuch genommen. Die zu Beginn des Versuches durchgeführte Testung des Serums auf haemolytische Eigenschaften für Schaferythrozyten ergab einen Titer von 1 : 4 bei Kaninchen Nr. 1 und 2 sowie 1 : 8 bei Kaninchen Nr. 3.

Die nach dem Schema vorgesehenen Seruminjektionen wurden streng eingehalten und stets subcutan appliziert. Für die 6. - 9. Injektion wurde eine 10%ige Schaferythrozyten-Suspension verwendet, die jeweils von 2 Schafen im Wechsel von einer zur anderen Injektion gewonnen wurde. Beide Schafe hatten nicht für die Serumgewinnung gedient.

Von allen 3 Kaninchen wurden die 9 Injektionen reaktionslos vertragen. 3 Tage nach der 9. Injektion wurden die 3 Seren zum erstenmal titriert. Die Titer betrugen bei

Kaninchen Nr. 1 1 : 1600
Kaninchen Nr. 2 1 : 1600
Kaninchen Nr. 3 1 : 3200

6 Tage nach der 9. Injektion erfolgte eine nochmalige Auswertung mit dem Ergebnis, daß alle 3 Seren den Titer von 1 : 1600 aufwiesen. Da der Titer uns nicht genügte, wurden am 7. Tage nach der 9. Injektion nochmal 0,5 ml gepackte Erythrozyten intravenös injiziert. Schockerscheinungen zeigten sich wieder nicht. Bei einer 3 Tage später durchgeführten Titerbestimmung lag bei allen 3 Tieren abermals ein Titer von 1 : 1600 vor.

2. Versuch

Diesem Versuch lag das gleiche Versuchsschema wie bei dem ersten Versuch zu Grunde. Nur wurde das Schafserum unmittelbar vor jeder Injektion jedesmal von einem anderen Tier gewonnen. Die Erythrozytengewinnung erfolgte jedesmal von einem anderen Schaf. Zur Injektion wurde eine 10%ige Suspension der Erythrozyten verwendet. 3 männliche Kaninchen mit dem Gewicht von 4125 g (Nr. 4), 6025 g (Nr. 5) und 4525 g (Nr. 6) wurden in den Versuch genommen. Die Auswertung der Seren vor Versuchsbeginn ergab bei Kaninchen Nr. 4 und Nr. 6 einen Titer von 1 : 4, bei Kaninchen Nr. 5 war der Titer negativ.

Kaninchen Nr. 6 starb einen Tag nach der 5. Injektion an einer hochgradigen Pneumonie mit Abszeßbildung in allen Lappen. Wir glauben nicht, daß ein ursächlicher Zusammenhang mit den Injektionen bestand, da das Schafserum stets frisch verwendet und auf Sterilität bei der Gewinnung geachtet wurde. Außerdem ist nicht gut denkbar, daß ausschließlich subcutan vorgenommene Injektionen eine derartige Pneumonie ausgelöst haben könnten, zumal die Injektionsstellen frei von entzündlichen Erscheinungen waren. Bei den 5 Injektionen wurden anaphylaktische Symptome nicht beobachtet. Aus den Aortenblutgerinsel des gestorbenen Kaninchens Nr. 6 wurde eine geringe Menge eines ziemlich klaren Serums gewonnen und der haemolytische Titer ermittelt.

Die Auswertung ergab einen Titer von 1 : 200. Die Titerbestimmung bei Kaninchen Nr. 4 und Nr. 5 zeigte Werte von 1 : 100, woraus wohl geschlossen werden kann, daß eine Schafserumapplikation eine, wenn auch geringgradige, Titerbildung bewirkt. Nach der 5. Injektion wurde die Immunisierung der Kaninchen Nr. 4 und Nr. 5 nach dem von ULRICH und MC ARTHUR angegebenen Schema fortgesetzt. Eine 4 Tage nach der 9. Injektion erfolgte Bestimmung des haemolysierenden Titers ergab bei

Kaninchen Nr. 4 den Titer 1 : 3200
Kaninchen Nr. 5 den Titer 1 : 1600.

Was die Beobachtung von anaphylaktischen Erscheinungen betrifft, ist zu bemerken, daß Kaninchen Nr. 4 bei der 8. Injektion, die am 17. Tage nach Beginn des Versuches mit 0,2 ml Erythrozyten-Suspension intravenös erfolgte, deutliche Schockerscheinungen zeigte. Die Herzfrequenz war stark erhöht, die Augen waren starr, die Atmung angestrengt und gepresst. Die anfänglich einsetzende Unruhe wurde von Apathie abgelöst. Das Kaninchen erholte sich innerhalb der nächsten Stunden und ließ bei den folgenden Injektionen keine Schockerscheinungen mehr erkennen. Das Kaninchen Nr. 5 blieb bei allen Injektionen frei von anaphylaktischen Erscheinungen.

3. Versuch

Dieser Versuch wurde ebenfalls nach dem gleichen Versuchsschema wie oben durchgeführt. Die roten Blutkörperchen für die Sensibilisierung wurden für jede Injektion frisch und nur von einem bestimmten Schaf entnommen und durch Schütteln defibriniert. Das Schafserum stammte von dem gleichen Tier.

Zwei weibliche Kaninchen Nr. 10 (5025 g) und Nr. 11 (4260 g) standen für den Versuch zur Verfügung. Ihr Serum hatte vor Versuchsbeginn einen unspezifischen haemolysierenden Titer von 1:4 bzw. 1:10. Nach den subcutanen Seruminjektionen wurde der Zwischentiter bestimmt. Er lag in beiden Fällen 5 Tage nach der 5. Injektion bei 1:200. Anschließend wurden die intravenösen Injektionen mit 10%iger Erythrozyten-Suspension durchgeführt. Anaphylaktische Erscheinungen wurden nicht beobachtet. 7 Tage nach der 9. Injektion wurde das Serum ausgewertet mit dem Ergebnis, daß beide Tiere einen Titer von 1:400 aufwiesen.

4. Versuch

Im Unterschied zu den drei vorhergehenden Versuchen wurde das Schafblut für die Serumgewinnung vor der ersten Injektion einmal für alle Injektionen von einem Schaf entnommen, also von dieser bis zur 5. Injektion (9 Tage) bei 5°C aufbewahrt. Ebenfalls wurde das für die Erythrozytengewinnung benötigte Schafblut vor der 6. Injektion einmal vom selben Schaf entnommen. Das Blut wurde ungewaschen bis zur 9. Injektion (6 Tage) bei 5°C aufbewahrt. Davon wurde die für die jeweilige Injektion notwendige Menge genommen und gewaschen. Die sich daraus ergebenden gepackten Erythrozyten wurden zu einer 10%igen Suspension verdünnt. Das Injektionsschema wurde nach Menge und Zeit eingehalten. 2 männliche Kaninchen Nr. 12 (4635 g) und Nr. 13 (4280 g) dienten für den Versuch. Vor Versuchsbeginn wurde bei Kaninchen Nr. 12 ein haemolytischer Titer von 1:8 und bei Nr. 13 von 1:10 ermittelt. Der Zwischentiter 5 Tage nach der 5. Injektion lag bei beiden Kaninchen bei 1:200. 7 Tage nach der letzten Erythrozyteninjektion konnten bei Kaninchen Nr. 12 ein Titer von 1:400 und bei Nr. 13 ein Titer von 1:800 festgestellt werden.

5. Versuch

Das Serum wurde jedesmal frisch von einem Schaf gewonnen. Auch das Blut für die Erythrozyten-Suspension wurde von demselben Tier für jede Injektion frisch entnommen. Doch wurde das Defibrinieren nicht durch Ausschütteln, sondern durch Na-Citrat (3,8%) bewirkt. Die Erythrozyten wurden wie üblich gewaschen und nach dem Schema injiziert.

Für den Versuch standen 2 männliche Kaninchen Nr. 14 (4910 g) und Nr. 15 (4160 g) zur Verfügung. Der Normaltiter betrug in beiden Fällen 1:4. 5 Tage nach der 5. Seruminjektion wurde der Zwischentiter bestimmt. Er betrug in beiden Fällen 1:100. Unmittelbar nach der 9. Injektion traten bei Kaninchen Nr. 14 leichte Schockerscheinungen auf, doch erholte es sich schnell wieder. Der Titer wurde 6 Tage nach der 9. Injektion bestimmt und betrug bei Kaninchen Nr. 14 1:400. Kaninchen Nr. 15 zeigte nach der halben Dosis der 9. Injektion starke Schockerscheinungen, wobei tonisch-klonische Krämpfe und hochgradige Atembeschwerden sowie beschleunigter Herzschlag beobachtet wurden. Das Tier starb etwa 10 Minuten nach der Injektion. Es wurde durch Halsschnitt entblutet (33), um das Blutserum zu gewinnen. Der haemolysierende Titer belief sich auf 1:200.

2. Versuchsreihe

Methode nach SAWYER und BOURKE (48), 6. Versuch.
Die Methode geht von dem Gedanken aus, daß die bei der Sensibilisierung von Kaninchen auftretenden Schockerscheinungen auf die Haemoglobinfraktion zurückzuführen sind und bedient sich des Zellstromas der Erythrozyten zur Immunisierung. Die Technik der Zellstromaherstellung ist auf Seite 11 beschrieben worden. Zur Herstellung diente Schüttelblut von 3 verschiedenen Schafen.
2 - 3 intravenöse Injektionen in Intervallen von je 5 Tagen sind üblich. Schon am 10. Tage soll ein genügend hoher Titer erzielt werden. 3 männliche Kaninchen Nr. 7 (4050 g), Nr. 8 (3525 g) und Nr. 9 (3950 g) standen zur Verfügung. 5 Tage nach der 2. Injektion wurde der haemolysierende Titer bestimmt.

Bei Kaninchen Nr. 7 erreichte er die Verdünnung 1:800
bei Kaninchen Nr. 8 erreichte er die Verdünnung 1:400
bei Kaninchen Nr. 9 erreichte er die Verdünnung 1:400.

Am selben Tage wurde die 3. Injektion vorgenommen. 5 Tage nach dieser Injektion ergaben sich die Werte von

1:1600 bei Kaninchen Nr. 7
1: 800 bei Kaninchen Nr. 8
1: 800 bei Kaninchen Nr. 9

Auf eine 4. Injektion wurde verzichtet. Schockerscheinungen wurden nicht beobachtet.

3. Versuchsreihe

Methode nach dem HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamt (27) unter Anwendung von Antihistamin nach KOSCHUCHAROFF (30).

7. Versuch

In einem Intervall von 3 Tagen wurden Kaninchen 3 mal mit gepackten, roten Hammelblutkörperchen i.v. sensibilisiert. Die Injektionsmenge betrug bei der 1. Injektion 4,0 ml, bei der 2. Injektion 3,0 ml und bei der 3. Injektion 1,5 ml. Um einen möglichen anaphylaktischen Schock bei der 3. Injektion zu vermeiden, wurde, dem Vorschlag von KOSCHUCHAROFF folgend, kurz vor dieser Injektion das Antihistaminpräparat "Avil" (Hoechst) in einer Menge von 1,0 ml intravenös injiziert.

Für den Versuch dienten die Kaninchenböcke Nr. 16 (4530 g), Nr. 22 (4560 g), Nr. 23 (4300 g), Nr. 24 (4230 g) und die Häsinnen Nr. 17 (6500 g), Nr. 18 (4700 g). Kaninchen Nr. 24 lag am 12. Tag tot im Stall. Es hatte alle 3 Injektionen ohne Schock überstanden und zeigte keinerlei klinische Symptome einer Anaphylaxie. Der Zerlegungsbefund ergab eine trübe Schwellung der Leber und der Nieren. In den Körperhöhlen befand sich Transsudat, die Blutgefäße des Darmes waren erweitert und stark mit Blut gefüllt. Ein kausaler Zusammenhang mit den 3 Erythrozyteninjek-

tionen ist möglich, jedoch nicht wahrscheinlich. Der haemolysierende Endtiter konnte bei diesem Serum nicht bestimmt werden. Kaninchen Nr. 23 wurde bei der 2. Injektion am 4. Tage nur 2,5 ml gepackte Erythrozyten injiziert, da es bei Beginn der Injektion starke Schockerscheinungen zeigte. Die anaphylaktischen Erscheinungen wiederholten sich nach mehreren Stunden und dauerten bis zum 7. Tage. Am selben Tage starb das Kaninchen. Das Blut war haemolytisch und für eine Titerbestimmung nicht geeignet. 6 Tage nach der 3. Injektion wurde der Titer der Kaninchen Nr. 16 - 18 und Nr. 22 ausgewertet. Er betrug bei Kaninchen Nr. 16 1:800, bei Nr. 17 1:400, Nr. 18 1:800 und bei Nr. 22 1:6400. Den Tieren Nr. 16 - 18 wurde 9 Tage nach der 3. Injektion noch je 1,0 ml gepackte Erythrozyten ohne vorherige Avilgabe injiziert. Die Haemolysintiter erhöhten sich nicht. Schockerscheinungen traten nicht auf.

4. Versuchsreihe

Methode nach DARTER (13).

Diese Methode bediente sich der intracutanen und der intravenösen Injektion von steigenden Mengen Schafblutkörperchen im Rhythmus von 2 - 3 Tagen. 7 Injektionen werden insgesamt ausgeführt. Das Injektionsschema ist auf Seite 6 dargestellt.

3 männliche Kaninchen Nr. 19 (3790 g), Nr. 20 (4230 g) und Nr. 21 (4450 g) wurden für den Versuch verwendet. Der Normaltiter wurde nicht bestimmt. Nach den 5 intracutanen Injektionen wurde am 12. Tag eine Titerbestimmung vorgenommen. Sie ergab bei allen 3 Kaninchen einen Titer von 1:200. Bei der 6. und 7. Injektion wurde je 1,0 ml einer 20%igen Erythrozyten-Suspension, die jedesmal von verschiedenen Schafen gewonnen worden war, intravenös gegeben. Schockerscheinungen traten nicht hervor. Eine 8 Tage nach der 7. Injektion durchgeführte Titerbestimmung ergab: bei Kaninchen Nr. 19 einen Titer von 1:1600, bei Nr. 20 einen von 1:200 und bei Nr. 21 einen von 1:3200.

Durch die intracutanen Injektionen von Hammelerythrozyten entstanden lokale allergische Entzündungsprozesse, die sich auf den durch die Injektionsflüssigkeit infiltrierten Bezirk beschränkten und dem Bild des Arthus-Phänomens entsprachen. Die Haut wurde später nekrotisch, und es bildete sich ein brauner Schorf, der nach etwa 3 Wochen abgestoßen wurde. Die Verheilung erfolgte ohne Narbenbildung. Das Kaninchen Nr. 21 fraß zeitweise sehr schlecht und war etwas apathisch, Erscheinungen, die vermutlich mit den relativ großen Hautdefekten im Zusammenhang standen. Das Tier erholte sich nach Abheilen der entzündlichen Defekte. Die anderen beiden Tiere Nr. 19 und Nr. 20 ließen, abgesehen von den lokalen allergischen Hautphänomenen, keine krankhaften Erscheinungen erkennen.

5. Gesamtergebnis

Zur besseren Übersicht sind die Gesamtergebnisse der 4 Versuchsreihen in Tabelle IV zusammengestellt. Unter Normaltiter sind die Verdünnungsstufen der Kaninchenseren zu verstehen, die ohne vorherige Sensibilisierung mit Schaferythrozyten eine vollständige Haemolyse zeigen. Als Zwischentiter wurden die Ergebnisse einer Prüfung auf die Wertigkeit vor abgeschlossener Sensibilisierung bezeichnet.

TABELLE IV

Vergleich der Ergebnisse der Versuchsreihen I - IV.

Versuchsreihe nach der Methode von	Kan. Nr.	Geschl.	Gewicht in g	haemolysierend. Normaltiter	Zwischentiter	Endtiter
ULRICH und MC ARTHUR	1	männl.	3350	1:4	nicht bestimmt	1:1600
	2	männl.	3490	1:8	"	1:1600
	3	männl.	3300	1:8	"	1:3200
	4	männl.	4125	1:4	1:100	1:3200
	5	männl.	6025	kein	1:100	1:1600
	6	männl.	4525	1:4	1:200	------
	10	weibl.	5025	1:4	1:200	1: 400
	11	weibl.	4260	1:10	1:200	1: 400
	12	männl.	4630	1:8	1:200	1: 400
	13	männl.	4280	1:10	1:200	1: 800
	14	männl.	4910	1:4	1:100	1: 400
	15	männl.	4160	1:4	1:100	1: 200
SAWYER und BOURKE	7	männl.	4050	nicht bestimmt	1:800	1:1600
	8	männl.	3525	"	1:400	1: 800
	9	männl.	3950	"	1:400	1: 800
HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamt kombiniert mit KOSCHUCHAROFF	16	männl.	4530	nicht bestimmt	nicht bestimmt	1:1600
	22	männl.	4560	"	"	1:6400
	23	männl.	4300	"	"	------
	24	männl.	4230	"	"	------
	17	weibl.	6500	"	"	1: 400
	18	weibl.	4700	"	"	1: 800
DARTER	19	männl.	3790	nicht bestimmt	1:200	1:1600
	20	männl.	4230	"	1:200	1: 200
	21	männl.	4450	"	1:200	1:3200

Zu Tabelle IV.

Für die Sensibilisierung der Kaninchen nach der Methode von ULRICH und MC ARTHUR wurden insgesamt 12 Kaninchen benutzt, von denen 11 vor der Sensibilisierung Normaltiter von 1:4 bis 1:10 aufwiesen. Die Behandlung mit Schafserum bewirkte in 9 Fällen einen Titeranstieg auf 1:100 (4 mal) und 1:200 (5 mal). Brauchbare Titer in Höhe von 1:1600 und 1:3200 wurden bei 5 Kaninchen, die mit frisch gewonnenem Schafserum und Schaferythrozyten behandelt worden waren, erzielt. Dabei schien es gleichgültig zu sein, ob das Serum eines oder mehrerer Schafe verwendet wurde. Dagegen erzielten die Erythrozyten von mehreren Schafen höhere Titer als die von nur einem Schaf. Anaphylaktische Erscheinungen kamen bei einem Kaninchen zur Beobachtung, führten aber nicht zum Tode. In den anderen Versuchen nach der gleichen Methode mit 7 Kaninchen waren die Ergebnisse nicht befriedigend. In einem Fall wurden die Kaninchen mit bis 6 Tage alten Erythrozyten sensibilisiert, im anderen Falle wurde das Blut in 3,8%igem Na-Citrat aufgefangen, um die Blutgerinnung zu verhindern.

Die Methode nach SAWYER und BOURKE erzielte bei einem von 3 Kaninchen einen brauchbaren Titer von 1:1600. Anaphylaktische Erscheinungen traten nicht auf.

Mit der Methode des HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamtes gelang es, bei 2 von 6 sensibilisierten Kaninchen brauchbare Titer von 1:6400 und 1:1600 zu erzielen. Bei einem Kaninchen traten während der 2. Injektion starke Schockerscheinungen auf, die aber erst am 7. Tage zum Tode des Tieres führten. Ein weiteres Kaninchen starb ohne klinisch erkennbare Ursache. Die restlichen Kaninchen zeigten keine Schockerscheinung.

Von den 3 nach der Methode von DARTER sensibilisierten Kaninchen bildeten 2 einen brauchbaren haemolysierenden Ambozeptor mit dem Titer von 1:3200 und 1:1600. Durch die intracutanen Injektionenwurden starke Hautdefekte hervorgerufen, aber es konnten keine anaphylaktischen

Schockerscheinungen beobachtet werden.

Um den Einfluß des Körpergewichtes der Kaninchen auf die Ambozeptorbildung festzustellen, wurden die 21 für den Versuch verwendeten Kaninchen nach ihren Gewichten und den erzielten Endtitern in Tabelle V zusammengestellt.

TABELLE V

Vergleich der Körpergewichte der Kaninchen mit den erzielten Endtitern.

Körpergewicht	Endtiter 1: 200	400	800	1600	3200	6400	Zahl der Kaninchen
3000g - 4000g	-	-	2	3	1	-	6
4000g - 5000g	2	3	3	1	2	1	12
über 5000g	-	2	-	1	-	-	3

Die geringe Zahl der Kaninchen in den einzelnen Gewichtsklassen zwingt zu einer vorsichtigen Beurteilung. Soviel dürfte aber aus den Zahlen hervorgehen, daß das Gewicht keinen wesentlichen Einfluß auf die Titerbildung hat. In allen Gewichtsklassen befanden sich Tiere mit brauchbaren und unbrauchbaren haemolytischen Ambozeptoren.

IV. Besprechung

Der Selbstherstellung eines haemolytischen Ambozeptors für die KBR sind dadurch erhebliche Grenzen gesetzt, daß einerseits Verluste an Kaninchen durch anaphylaktischen Schock bei der üblichen Technik unvermeidbar sind, andererseits nicht vorauszusehende Fehlergebnisse durch Ausbleiben genügend hoher Titer in Kauf genommen werden müssen.

Die in der Literatur von Zeit zu Zeit empfohlenen Modifizierungen der Sensibilisierungsmethoden von Kaninchen zeigen, daß die bisher bekannten Methoden verbesserungsbedürftig sind. Leider erscheinen aber nur selten Arbeiten, die sich mit den Verbesserungsvorschlägen der verschiedenen Autoren beschäftigen und klar herausstellen, ob die empfohlenen Abänderungen mehr zu bieten vermögen als die althergebrachte Technik.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die von mehreren Autoren vorgeschlagenen Änderungen der Immunisierungsarten zu überprüfen und zu klären, ob es eine besonders brauchbare Technik gibt.

Zunächst wurde die von ULRICH und MC ARTHUR empfohlene Methode der Immunisierung einer Nachprüfung unterzogen. Das Bemerkenswerte an dieser Methode ist, daß 30 Minuten vor der Hauptinjektion durch eine geringe Menge des gleichen Injektionsmaterials die Kaninchen desensibilisiert werden sollen, um anaphylaktische Erscheinungen zu vermeiden. Beide Autoren geben der Überzeugung Ausdruck, daß ihre Methode optimal ist. Sie erreichten Titer von 1:10000 bis 1:20000, ohne daß anaphylaktische Symptome beobachtet wurden. THELMA und Mitarbeiter untersuchten 5 verschiedene Methoden, die in den USA üblich sind, und fanden die Methode von ULRICH und MC ARTHUR als sehr günstig. RUGE (43) bestätigte dieses Ergebnis.

In 5 Versuchen an insgesamt 12 Kaninchen wurde die Methode der Sensibilisierung von ULRICH und MC ARTHUR durchgeführt, wobei in jedem Fall das Immunisierungsschema eingehalten wurde. Jedoch wurde mit den Schafen, die zur Serum- und Erythrozytengewinnung dienten, gewechselt oder die Behandlung der Erythrozyten (frisch gewonnene bzw. bei 5°C aufbewahrte Erythrozyten) wurde unterschiedlich gehandhabt.
In jedem Fall wurde eine 10%ige Suspension der Erythrozyten zum Sensibilisieren benutzt. Bei 5 Kaninchen ergaben sich brauchbare Titer von 1 : 1600 (3 mal) und 1 : 3200 (2 mal). Es handelte sich in diesen Fällen ausschließlich um Tiere, die mit Serum bzw. Erythrozyten, die für jede Injektion frisch gewonnen wurden, sensibilisiert worden waren. Für die Serum- und Erythrozytengewinnung wurden verschiedene Schafe verwendet. Von 6 zu diesen Versuchen verwendeten Kaninchen starb 1 an eitriger Pneumonie. Ein weiteres Kaninchen zeigte bei der desensibilisierenden Dosis der 8. Injektion am 17. Tage deutliche Schockerscheinungen.

Das Ergebnis dieses Versuches war relativ günstig, jedoch ließ es keine Zweifel, daß die Methode von ULRICH und MC ARTHUR anaphylaktische Symptome nicht sicher vermeidet. Die von den Autoren angegebenen Titer von 1 : 10000 bis 1 : 20000 wurden nicht erzielt. Aber ein direkter Titervergleich ist nicht möglich, da die Methode der Auswertung der Autoren nicht angegeben worden ist. Die von THELMA und Mitarbeitern und RUGE mitgeteilten günstigen Erfahrungen mit dieser Methode können wir mit geringen Einschränkungen bestätigen.

Ähnlich wie THELMA und Mitarbeiter feststellten, erwiesen sich auch in unseren Versuchen frisch gewonnene rote Hammelblutkörperchen als besser immunisierend als die bei 5°C aufbewahrten.

Die Verwendung von 3,8%igem Na-Citrat bei der Blutentnahme für die Erythrozytengewinnung ist nach unseren Erfahrungen nicht zu empfehlen, da die mit derartigen Erythrozyten sensibilisierten Kaninchen nach der 9. Injektion deutliche Schockerscheinungen zeigten und unterwertige Seren lieferten.

In einem weiteren Versuch mit Verwendung nur eines bestimmten Schafes für die Serum- und Erythrozytengewinnung blieben die Seren bei den im Versucn stehenden Kaninchen ebenfalls unterwertig. Anaphylaktische Symptome kamen nicht zur Beobachtung.

Aufgrund unserer Versuchsergebnisse möchten wir zusammenfassend feststellen, daß die Methode von ULRICH und MC ARTHUR bei Verwendung frisch gewonnenen Injektionsmaterials von verschiedenen Schafen brauchbare Ergebnisse erzielt. Besonders hochwertige haemolysierende Seren scheint diese Methode allerdings nicht zu erzielen. Schockerscheinungen lassen sich nicht vermeiden.

Die Ergebnisse, die SAWYER und BOURKE durch die Sensibilisierung der Kaninchen mit Erythrozytenstroma erzielten, konnten nicht bestätigt werden. Nach Angaben der Autoren sollen schon 2 Injektionen genügen, um einen hochwertigen Ambozeptor zu erzielen. Bei unseren Versuchen wiesen die Seren nach der 2. Injektion einen Titer von 1:400 (2 mal) bzw. 1:800 (1 mal) auf. Nach der 3. Injektion wurde der Titer 1:800 (2 mal) und 1:1600 (1 mal) erreicht, ein Wert, der wesentlich unter den von SAWYER und BOURKE angegebenen Werten von 1:5000 bis 1:12000 lag. Anaphylaktische Erscheinungen traten nicht auf. THELMA und Mitarbeiter bezeichneten die Methode von SAWYER und BOURKE als unbefriedigend. Wir sind der Meinung, daß diese Methode nichts wesentlich Besseres als andere Methoden leistet und keine besonders hochwertigen Ambozeptoren liefert. Wir halten es für möglich, daß durch diese Methode anaphylaktische Erscheinungen vermieden werden können.

Das vom HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamt übernommene Verfahren der Ambozeptorherstellung wird von uns seit Jahren durchgeführt, ist aber leider mit Verlusten durch anaphylaktischen Schock belastet. Deshalb waren wir bemüht, die Verluste durch die von KOSCHUCHAROFF (30) vorgeschlagenen Antihistamingaben zu vermeiden. Da Schockerscheinungen nach unseren Erfahrungen in der Hauptsache 7 - 10 Tage nach der ersten Erythrozyteninjektion auftreten, injizierten wir Antihistaminpräparat "AVIL" unmittelbar vor der 3. Injektion am 7. Tage in einer Menge von 1,0 ml intravenös. Ein Kaninchen von dem zum Versuch benutzten 6 Tieren ging bereits nach der 2. Injektion durch Schock verloren. Ein zweites Kaninchen starb am 12. Tage, obwohl es während der drei Injektionen keine Symptome der Anaphylaxie gezeigt hatte. Von den 4 übrig gebliebenen Kaninchen erzielte eines einen Titer von 1:6400, 3 blieben in ihrer Serumwertigkeit unter dem für die KBR notwendigen Minimaltiter.

Da schon die BEHRING-Werke und RUGE die Ergebnisse von KOSCHUCHAROFF nicht bestätigen konnten, haben wir lediglich die Anwendung von Antihistaminpräparaten, um anaphylaktischen Erscheinungen vorzubeugen, von KOSCHUCHAROFF übernommen. Bei der unter Antihistaminwirkung stehenden 3. Injektion traten mit Ausnahme eines nicht klaren Falles keine Schockerscheinungen auf. Daraus schließen wir, daß durch Antihistamininjektionen Schockerscheinungen vorgebeugt werden kann. Wir möchten empfehlen, bereits bei der 2. Injektion Antihistamin zu verwenden, um Schockerscheinungen zu vermeiden. Die Verlustrate scheint mit Antihistamin geringer zu sein als ohne. Ein hemmender Einfluß des Antihistamins "AVIL" von Hoechst auf die Antikörperbildung dürfte nicht zu befürchten sein.

DARTER schlug vor, zunächst Gesamtblut von Schafen 4 mal intracutan zu applizieren und dann 2 intravenöse Injektionen einer 20 %igen Hammelerythrozyten-Suspension

im Intervall von je 3 Tagen folgen zu lassen. Er erreichte mit dieser Injektionsart Titer von 1:20000. 3 zu diesem Versuch von uns eingesetzte Kaninchen erzielten bei Anwendung der Auswertungsmethode nach KOLMER nur einen Titer von 1:3200, 1:1600 und 1:200, wobei anaphylaktische Schockerscheinungen ausblieben. Lokale Hautreaktionen, die bei einem Kaninchen das Allgemeinbefinden vorübergehend stark beeinflußten, ließen sich an den Injektionsstellen nicht vermeiden. Die Methode nach DARTER scheint brauchbar zu sein. Die Technik des HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamtes ist ebenfalls ein Verfahren, das gutes leistet. Nur sind Verluste durch Anaphylaxie unvermeidbar. Die alte in früheren Jahren schon bekannte Erfahrung, daß die meisten Kaninchenseren ohne Sensibilisierung geringe Normaltiter aufweisen, konnten wir bestätigen. Darüber hinaus trat bei unseren Versuchen hervor, daß schon allein die Injektion von Schafserum einen Anstieg des haemolysierenden Normaltiters auf 1:100 bis 1:200 bewirkte.

Es ist unwahrscheinlich, daß das Körpergewicht der Kaninchen einen wesentlichen Einfluß auf die Titerbildung hat. Zu alte und zu schwere Kaninchen aber sind im allgemeinen für die Ambozeptorgewinnung ungeeignet. Man sollte daran festhalten, daß Kaninchen, die etwa 6 - 8 Monate alt sind und ein für ihre Rasse und ihr Alter angemessenes Körpergewicht haben, die besten Ambozeptorbildner sind. Doch werden nicht alle Kaninchen hochwertige Seren liefern und den Sensibilisierungsprozeß ohne anaphylaktische Erscheinungen überleben.

Das Geschlecht der Tiere dürfte keinen maßgebenden Einfluß auf die Titerbildung ausüben.

Die Bildung hochwertiger haemolysierender Seren entspringt offenbar einer individuellen Leistung des einzelnen Tieres. Auch scheint die Eigenschaft

der Empfindlichkeit oder der Resistenz gegenüber sensibilisierenden Einflüssen individuell begründet zu sein. DOERR führt diese Unterschiede auf die verschiedene Reizbarkeit der antikörperbildenden Gewebe zurück. da man nach DOERR bei Inzuchtstämmen von Meerschweinchen, Stämme mit sehr gutem und andere mit sehr schlechtem Antikörperbildungsvermögen fand, kann auf eine Vererbung dieser Fähigkeit geschlossen werden. Durch eine gezielte Züchtung der Kaninchen ließe sich vielleicht die Ambozeptorherstellung verbessern. Nach DOERR ist eine solche Züchtung aber bisher nicht durchgeführt worden. Die in der Literatur von verschiedenen Autoren oftmals sehr optimistisch dargestellten Versuchsergebnisse, die von anderen Untersuchenden nicht bestätigt wurden, finden offenbar dadurch ihre Erklärung, daß die Fähigkeit der Kaninchen, auf die Immunisierung mit roten Hammelblutkörperchen gut anzusprechen, bei verschiedenen Versuchsanstellern unterschiedlich gewesen ist. Diese Hypothese wäre einer Nachprüfung wert und sollte Anregungen geben, die Gewinnung brauchbarer haemolytischer Ambozeptoren für die KBR an Inzuchtstämmen verschiedener Kaninchenrassen durchzuführen, um zu erfahren, ob es für diesen Zweck besonders geeignete Kaninchenstämme gibt.

V. Zusammenfassung

1) Die Methode nach ULRICH und MC ARTHUR erzielte bei 5 von 12 sensibilisierten Kaninchen einen brauchbaren Ambozeptor in Höhe von 1:1600 bis 1:3200. Verluste durch anaphylaktischen Schock ließen sich mit dieser Methode nicht sicher vermeiden.

2) Die Methode von SAWYER und BOURKE konnte bei 1 von 3 Kaninchen einen brauchbaren Ambozeptor von 1:1600 erzielen. Ausfälle durch Anaphylaxie kamen nicht vor.

3) Mit der Methode des HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamtes in Verbindung mit der Anwendung von AVIL-Hoechst als Antihistaminikum vor der 3. Injektion wurde von 1 Kaninchen ein hochwertiger Ambozeptor mit dem Titer von 1:1600 gebildet. Bei 3 Kaninchen wurden nur unterwertige Seren erzielt. Ein Kaninchen ging durch Anaphylaxie bei der 2. Injektion von gepackten Hammelerythrozyten verloren und ein weiteres starb unter Erscheinungen, die nicht eindeutig für eine Anaphylaxie sprachen.

4) Die Methode von DARTER erzielte bei 2 von 3 Kaninchen einen brauchbaren haemolytischen Ambozeptor von 1:1600 und 1:3200 und verlief ohne Verluste durch Anaphylaxie.

5) Die Eigenschaft, hochwertige haemolytische Ambozeptoren zu produzieren, dürfte auf einer individuellen Leistung des Kaninchens beruhen und läßt sich ebenso wie die anaphylaktische Emdpfindlichkeit durch keine Untersuchungsmethoden im voraus bestimmen. Diese Eigenschaft ist wahrscheinlich erblich und sollte Veranlassung geben, Kaninchenstämme zu züchten, die sich besonders für die Sensibilisierung mit roten Hammelblutkörperchen eignen.

Literaturverzeichnis

(1) ABDERHALDEN,E. — Methoden der Haemolyseforschung. Handbuch der biol.Arbeitsmetoden 2/II , 876 Verl. Urban & Schwarzenberg Berlin - Wien 1933

(2) BECHOLD,E. und ROSENBERG,A. — Elektro-Ultrafiltration von Gelatine und Leim. Biochem. Zschr. 175, 85 (1925)

(3) BECKER,M. — Zur Frage der Bereitung von haemolytischem Serum. Zbl. Bakt. I Orig. 99, 568 (1926)

(4) BEHRING-WERKE — Briefliche Mitteilung vom 23.12.1964

(5) BERTARELLI,E. — Über aktive und passive Immunisation der Neugeborenen und Säuglinge auf dem Wege der Verdauungsorgane. Zbl. Bakt. I Orig. 39, 285 (1926)

(6) BITTER,L. — Die Konservierung von agglutinierenden hämolysierenden Seren. Zbl. Bakt. I Orig. 87, 560 (1922)

(7) BORDET,J. und GENGOU,O. — Sur l'Existence de Substances sensibilisatorices dans la plupart des serum antimikrobiens. Ann. Inst. Pasteur 15, 289 (1901)

(8) BOROWSKAJA,D. — Zur Frage der Bereitung von haemolytischem Serum. Zbl. Bakt. I Orig. 98, 425 (1926)

(9) BOYD, C.
Fundamentals of Immunology.
Interscience Publishers, INC, New York
4. Aufl. 629 (1956)

(10) CAMUS, L.
zit.n. (1)
Compt.rend.Soc.biol.
55, 815 (1903)

(11) COHEN, H.H.
Quantitative Complement Fixation, I.Standardisierung von Complement, Schafblut und Ambozeptor.
Antonie van Leeuvenhoek
17, 247 (1951)

(12) DALE, H.H.
Histamin shock.
Brit. J. Exper. Path.
1, 103 (1920)

(13) DARTER, L.A.
Procedure for production of anti-sheep hemolysin.
J. Laborat. Clin. Med.
41, 653 (1953)

(14) DOERR, R.
Allergie und Anaphylaxie.
Handbuch pathg. Mikroorg.
1/II, 780 (1928)

(15) DOLD, H. und H. GROSS
Weitere Studien über den Einfluß der Technik und anderer äußerer Faktoren auf die Titerhöhe hämolytischer Ambozeptoren.
Klin. Med. 22, 1302 (1926)

(16) EHRLICH, P.
Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung.
Verl. A.Springer, Berlin 1956

(17) ENGELHARDT, G.
Die Bedeutung des vegetativen Nervensystems für die Antikörperbildung und den anaphylaktischen Schock.
Dtsch. med. Wschr.
82, 658 (1957)

(18) FISCHER, R. Die Anaphylaxie gegen Erythrozyten-Suspensionen.
Zschr. Hyg. 103, 659 (1924)

(19) FLOSDORF, E. und H. MUDD zit.n. (33)
J. Immunol. 29, 389 (1935)

(20) FORSSMANN, J. Die Herstellung hochwertiger spezifischer Haemolysine ohne Verwendung von Schafblut, ein Beitrag zur Lehre heterologer Antikörperbildung.
Biochem. Zschr. 37, 78 (1911)

(21) FORSSMANN, J. Die heterogenetischen Antigene, besonders die sog. Forssmann-Antigene und ihre Antikörper.
Handbuch pathg. Mikroorg. 3/I, 469 (1930)

(22) FRIEDBERGER, E. Über das Verhalten der Komplemente in hypertonischen Salzlösungen.
Zbl. Bakt. I Orig. 46, 441 (1908)

(23) HALLMANN, L. Bakteriologie und Serologie.
Verl. G.Thieme Stuttgart 3. Aufl. 1961

(24) HAMMERSCHMIDT, J. Über Komplementkonservierung.
Münchn. med. Wschr. 1, 122 (1922)

(25) HANSEN, K. Allergie.
Verl. G.Thieme Stuttgart 3.Aufl. 1957

(26) HARTWIGK, H. Persönliche Mitteilung 1965

(27) HEERES-VETERINÄR-Untersuchungsamt Arbeitsanweisung für die Blutuntersuchung zur Feststellung des Rotzes, der Beschälseuche, der Bruzellose, der Tuberkulose und anderer Infektionskrankheiten.

(28) JAKOBSTHAL, E. und A. SCHUBACK
Morphologie und Serologie des Normalblutes der Laboratoriumstiere.
Handbuch pathg. Mikroorg. 3/I, 337 (1930)

(29) KOLMER, J.A.
Studies in the standardization of the Wassermann-Reaktion.
Amer. J. Syph. 3 und 5 (1919-1921)

(30) KOSCHUCHAROFF, P.
Ein Beitrag zur Gewinnung von hochwertigen haemolytischen Ambozeptoren.
Zbl. Bakt. I Orig. 173, 609 (1958)

(31) LANGE, C.
Lebensdauer der für die Wassermann-Reaktion benötigten Reagenzien.
Zschr. Immunit.forsch. 26, 396 (1917)

(32) LAUBENHEIMER, K.
Serumdiagnose der Syphilis.
Handbuch pathg. Mikroorg. 7/I, 216 (1930)

(33) LAUBENHEIMER, K.
ebenda S.233

(34) LAUBENHEIMER, K. und VOLLMAR, H.
Über die Fraktionierung des haemolytischen Ambozeptorserums.
Zschr. Hyg. 106, 202 (1926)

(35) LAZAR, E.
Über haemolytische Wirkungen des Froschserums.
Wien. klin. Wschr. 1057 (1964)

(36) LEIPERT, TH., W. PIRINGER und T. PILGERTORFER
Laboratoriumsdiagnostik.
Verl. Urban & Schwarzenberg Wien 1953 S.600

(37) LÜHRS, E.
Untersuchungen über Komplement, hämolytischen und komplementbindenden Ambozeptor.
Zschr. Inf.krkh. Haustiere 60, 86 (1944)

(38) METALNIKOFF, S. — Über hämolytisches Serum durch Blutfütterung. Zbl. Bakt. I Orig. 29, 531 (1901)

(39) MORGENROTH, J. — Untersuchungen über die Bindung von Diphtherietoxin und Antitoxin sowie über die Constitution des Diphtheriegiftes. Berl. klin. Wschr. 32, 526 (1904)

(40) RAYBAUD, A. und HAWTHORN — De la ponction capillaire du cœur chez le cobaye. Compt. rend. Soc. biol. 55, 815 (1903)

(41) RUBINSTEIN, M. — Sur la preparation des serum hemolytiques. Compt. rend. Soc. biol. 81, 303 (1918) Zbl. Bakt. I Ref. 70, 25 (1920)

(42) RUEDIGER, E.H. — A comparison of sex different antigens in the Wassermann-reaktion. J. Infect. Dis. 24, 31 (1919)

(43) RUGE, H. — Bemerkungen zu der Arbeit von P. Koschucharoff. Zbl. Bakt. I Orig. 177, 95 (1960)

(44) SACHS, H. — Hämolytische Serumwirkung (Hämolysine) und Komplement-bindung. Handbuch pathg. Mikroorg. 2/II, 779 (1929)

(45) SACHS, H. — Experimentelle spezifische Diagnostik mittels Agglutination, Bakteriede (Lyse) und Komplementbindung. Handbuch pathg. Mikroorg. 3/I, 203 (1930)

(46) SACHS, H.

Über die Vorgänge im Organismus bei der Transfusion fremdartigen Blutes.

Arch. Anat. u. Phys. Abt. Phys. S.494 (1903)

(47) SACHS, H. und A. KLOPSTOCK

Methoden der Hemolyseforschung.

Handbuch der biol. Arbeitsmethoden. 2/II, 876
Verl. Urban & Schwarzenberg Berlin-Wien 1933

(48) SAWYER, H.P. und R. BOURKE

Antisheep amboceptor production with elemination of rabbit shock.

J. Lab. Clin. Med. 31, 714 (1946)

(49) SCHMIDT, H.

Die Steigerung der Antikörperbildung durch intravenöse Manganchlorür-Einspritzungen.

Zbl. Bakt. I Orig. 95, 74 (1925)

(50) SCHMIDT, H.

Fortschritte der Serologie.

Verl. Dr.Steinkopff Darmstadt 2. Aufl. 1955 S.473

(51) SEZARY, A.

Sur la preparation des serum hemolytiques.

Compt. rend. Soc. biol. 81, 170 (1920)
Zbl. Bakt. I Ref. 70, 25 (1920)

(52) STOEKEL, S.

Über eine neue Methode der Konservierung verschiedener Immunsera und Antigene.

Wien. klin. Wschr. 49, 1513 (1910)

(53) THELMA, F., B.S. MURASCHI, M.GLADYS, B.GNESH, N.VICTOR und M.D.TOMPKINS

Eine vergleichende Untersuchung der Herstellungsmethoden von Antischaf-Ambozeptor.

Amer. J. Syph. 36, 476 (1952)

(54) ULRICH, C.A. und X.F. MC ARTHUR

An improvet method for the production of anti-sheep hemolysin.

Amer. J. Clin. Path. 12, 84 (1942)

(55) VASSILJEWA, V. Intrapulmonale Injektion von Hammelerythrozyten als Methode zur Erzielung eines haemolytischen Ambozeptors.
Vračebnoe delo Jg. 9,1407 (1926)
Ref. Zbl. gesamte Hyg.
14, 381 (1927)

(56) WALBUM, L.E. und S. SCHMIDT Die Bedeutung der Metallsalze für die Ambozeptorbildung.
Zschr. Immunit.forsch.
42, 32 (1925)

(57) WASSERMANN, A. und C. BRÜCK Ist die Komplementbindung beim Entstehen spezifischer Niederschläge eine mit der Präcipitierung zusammenhängende Erscheinung oder Ambozeptorwirkung.
Med. Klin. 1, 1409 (1905)

(58) ZÖLLNER, N. Ambozeptorbildung proteindefizid ernährter Kaninchen.
Arch. Hyg. 132, 69 (1950)

Danksagung

Herrn Professor Dr.H.Hartwigk möchte ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die Unterstützung bei ihrer Durchführung recht herzlich danken. Allen Angestellten des Institutes gilt mein Dank für ihre Hilfe.

L e b e n s l a u f

Am 10.4.1940 wurde ich als drittes Kind des Lehrers Dr. Heinz Lange und seiner Ehefrau Ingeborg geb. Speck in Heideanger/Lausitz geboren. Nach 8 Grundschuljahren in Halle/Saale kam ich 1954 in die 9. Klasse der Waldoberschule in Berlin-Charlottenburg. Das Abitur bestand ich im März 1959 an der Bertha-von-Suttner-Schule in Berlin-Reinickendorf. Im Sommersemester 1959 begann ich mit dem Studium der Veterinär-Medizin an der Freien Universität Berlin, an der ich 1961 die tierärztliche Vorprüfung und am 6. Juli 1964 das Staatsexamen ablegte. Seit dieser Zeit bin ich als Doktorand am Institut für Veterinär-Hygiene tätig.